

高效液相色谱法同时测定水产品中 6种喹诺酮药物的残留

钱卓真^{1,2}, 苏秀华³, 魏博娟⁴, 吴成业^{1,*}

(1.福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2.厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005;
3.福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002; 4.集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘 要: 建立用固相萃取-反相高效液相色谱法同时检测水产品中6种喹诺酮药物残留量的方法。通过对提取方法和C₁₈固相萃取柱净化条件、色谱条件选择与优化、洗脱液浓度和用量的选择方面的研究, 确定采用高效液相色谱分离、荧光检测器检测、外标法定量的分析方法。本方法对环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹标准曲线的线性回归系数均在0.99以上, 线性范围为0.02~2.0 μg/mL。以3倍信噪比 R_{SN} 计算, 环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星检出限为2 μg/kg, 噁喹酸、氟甲喹检出限为5 μg/kg; 以10倍信噪比 R_{SN} 计算, 环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星的定量下限为5 μg/kg; 噁喹酸、氟甲喹的定量下限为10 μg/kg。在南美白对虾、罗非鱼、鳊鱼、斑点叉尾鮰中进行这6种喹诺酮类药物加标回收率的验证实验, 实验结果满意, 回收率在78.8%~92.9%之间; 相对标准偏差为2.97%~7.10%。说明本方法简单、灵敏, 结果可靠, 可用于水产品中环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹的同时检测。

关键词: 反相高效液相色谱法; 荧光色谱; 喹诺酮类药物; 多残留检测; 水产品

High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Six Quinolone Residues in Aquatic Products

QIAN Zhuo-zhen^{1,2}, SU Xiu-hua³, WEI Bo-juan⁴, WU Cheng-ye^{1,*}

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China; 2. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A solid-phase extraction followed by reversed-phase high performance liquid chromatographic (SPE-RP-HPLC) method was presented for the simultaneous determination of 6 quinolone residues (enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid and flumequine) in aquatic products. Sample extraction, cleanup on a C₁₈ cartridge column and chromatographic separation were investigated. A RP-HPLC system equipped with fluorescence detector ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$) was used for analyzing 6 quinolones, and their quantification was achieved by external standard method. Six quinolones exhibited good linearity within the range of 0.02 - 2.0 μg/mL and the regression coefficients were all over 0.99. The developed method showed limits of detection of 2 μg/kg for ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and 5 μg/kg for oxolinic acid and flumequine ($R_{SN} = 3$), and limits of quantification of 5 μg/kg for ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and 10 μg/kg for oxolinic acid and flumequine ($R_{SN} = 10$). Satisfying results were obtained in spike recovery experiments and average spike recoveries of 5 replicates at three levels were within the range of 78.8% - 92.9%, with RSD range of 2.97% - 7.10%. This method, thanks to its simplicity, sensitivity and reliability, has good suitability for the simultaneous determination of 6 quinolone residues in aquatic products.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); fluorescence spectroscopy;

收稿日期: 2009-04-26

基金项目: 福建省地方标准渔业计划项目(闽海渔[2008]143号)

作者简介: 钱卓真(1981—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产品中兽药、农药残留检测研究。

E-mail: qianzhuozhen@126.com

* 通信作者: 吴成业(1954—), 男, 研究员, 学士, 主要从事水产品加工研究。E-mail: wcy@fjcs.ac.cn

quinolones ; multi-residue determination ; aquatic products

中图分类号 : S859.84 ; O657.72

文献标识码 : A

文章编号 : 1002-6630(2010)06-0185-05

环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹均属于喹诺酮类药物(quinolones, QNs)。喹诺酮类药物是继磺胺之后迅速发展起来的一类十分重要的人工合成抗菌药物,因其抗菌广谱、抗菌活性强、组织穿透力强、价格低廉、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点而广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的预防和治疗。此类药物主要用于预防和治疗鱼类疾病,少量使用还具有一定的促生长作用;过量使用或不当使用会造成动物源性食品中药物残留,若长期食用被此类药残污染的食品,人会产生耐药性和抗药性。严重时,会引起食用者产生远期毒性作用及潜在“三致”(致癌、致畸、致突变)作用^[1]。

因此,此类药物的残留问题越来越引起人们的关注。联合国粮农组织、世界卫生组织食品添加剂专家联席会议、欧盟都已制定了恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹在动物组织中的最高残留限量;美国FDA于2005年宣布禁止用于治疗家禽和鱼类细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用;日本也在肯定列表中对恩诺沙星、环丙沙星、噁喹酸、氟甲喹的最大残留限量进行了规定。目前用于QNs残留的检测方法有微生物法^[2]、酶联免疫吸附测定法(ELISA)^[3-5]、分光光度法^[6-7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8-10]、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)^[11-12]、毛细管区带电泳^[13],还可采用电解分析法^[14]等。但能够同时测定水产品可食性组织中环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹残留的检测方法未见报道。本研究旨在建立一种操作步骤较为简单,并可同时满足水产品可食性组织中上述6种QNs检测的多残留分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

南美白对虾、罗非鱼、鳊鱼、斑点叉尾鮰均购自厦门市农贸市场。

氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、噁喹酸、氟甲喹 德国 Dr 公司;乙腈、正己烷(均为色谱纯) 美国 Tedia 公司;四丁基溴化铵、无水硫酸钠、磷酸、氢氧化钠(均为分析纯);超纯水 Milli-Q 系统制备;氨水(纯度25%)。

Waters Breeze 液相色谱仪(配有 Waters2475 型荧光检测器和 Empower 色谱工作站) 美国 Waters 公司;FA25 型均浆机 Fluko 公司;MS2 型旋涡混合器、数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;PL203 型

电子分析天平、RAB204-E 型电子分析天平、320-S 型 pH 计 Mettler Toledo 公司;Milli-Q 超纯水器 美国 Millipore 公司;Bond Elut C₁₈ 固相萃取柱(填料量 500mg, 体积 3mL) 美国 Varian 公司。

1.2 标准溶液配制

准确称取诺氟沙星、氧氟沙星标准品 10.0mg,用 0.1mol/L HCl 溶液 10mL 溶解,再用乙腈定容于 100mL 棕色容量瓶中,此溶液质量浓度为 100μg/mL;准确称取恩诺沙星、环丙沙星标准品 10.0mg,再用甲醇定容于 100mL 棕色容量瓶中,此溶液质量浓度为 100μg/mL;准确称取噁喹酸、氟甲喹标准品 10.0mg,用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 10mL 溶解,再用乙腈定容于 100mL 棕色容量瓶中,此溶液质量浓度为 100μg/mL。根据检测要求用流动相稀释成相应的标准工作溶液。以各组分的色谱峰面积对质量浓度作线性回归,得定量标准曲线。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Zorbax Elipse XDB-C₁₈(4.6mm × 150mm, 5μm);柱温为 35℃;流动相为四丁基溴化铵(pH3.0)水溶液-乙腈体系(梯度洗脱程序见表1);流速为 0.9mL/min;18.5min 前激发波长 280nm、发射波长 480nm;18.5min 后激发波长 325nm、发射波长 365nm。

表1 HPLC 梯度洗脱程序流动相体积配比

Table 1 Mobile phase gradient program for HPLC analysis of 6 quinolones

| 时间/min | 0 | 14.0 | 15.0 | 24.0 | 25.0 | 30.0 |
|--|-----|------|------|------|------|------|
| 0.01mol/L 四丁基溴化铵 (pH3.0)-乙腈(94:6, V/V)/% | 100 | 100 | 60 | 60 | 100 | 100 |
| 乙腈/% | 0 | 0 | 40 | 40 | 0 | 0 |

1.4 样品前处理

称取匀质样品约 5g(精确至 0.01g)于 50mL 塑料离心管。加 20mL 酸化乙腈提取溶剂,加入 10g 无水硫酸钠,涡旋 1min,超声振荡 6min,2500r/min 离心 5min,取上清液转移至分液漏斗,残渣用 20mL 提取溶剂重复提取两次,合并上清液于上述分液漏斗中。向上述分液漏斗中加入 60mL 乙腈饱和正己烷溶液,置分液漏斗振荡器上 150r/min 剧烈振荡 20min,静置分层。下层乙腈转移至梨形瓶中,40℃ 水浴减压蒸发至干。将 C₁₈ 固相萃取柱用 3mL 甲醇、3mL 水、3mL 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)预淋洗活化。用 4mL 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)溶解梨形瓶中的残渣,转移提取液至 C₁₈ 固相萃取柱上,重复两次,过柱,3mL 水洗涤,弃去,5mL 25% 氨水-甲醇(25:75, V/V)洗脱。洗脱液于 50℃ 条件下 N₂ 吹干,1mL 流动相定容,过 0.22μm 微孔滤

膜后, 滤液待测。

2 结果与分析

2.1 色谱条件选择与优化

2.1.1 缓冲溶液的选择及 pH 值的影响

QN_s 具有两性基团, 属于酸碱两性化合物, 在水溶液中通常以离子形式存在。反相液相色谱分析时, 色谱峰容易拖尾, 所以通常选用酸性溶液作为流动相的组成部分, 再选用适当的离子对试剂和离子抑制试剂, 这有利于样品分离。根据国内外相关文献报道^[8-13], 在本实验条件下, 尝试乙腈、乙酸、甲酸、磷酸、柠檬酸、四丁基溴化铵、三乙胺、磷酸二氢钾之间多种配比的流动相条件, 经过多次比较优化, 采用乙腈-四丁基溴化铵溶液体系, 并同时考察了流动相中乙腈比例分离度的影响。结果表明: 当乙腈体积分数为 43.6%, 采用梯度洗脱程序, 这 6 种 QN_s 在 24min 内被洗脱且分离良好, 基线平稳, 峰型尖锐, 总体响应较高。

pH 值对保留时间和分离效果影响较大, 考察了 6 种药物在 pH2.0~5.0 范围内的分离情况。在 pH3.0 时, 分离效果最好; 在 pH2.0~4.0 范围内 6 种喹诺酮类药物都能得到良好的分离, 但在 2.0 和 4.0 时峰型稍差; 在 pH5.0 时, 有些组分已不能完全分离, 且随着 pH 值的增大, 保留时间延长。所以本方法选择 pH3.0。6 种喹诺酮类药物混合标准溶液(1.0 μg/mL)的色谱图见图 1。

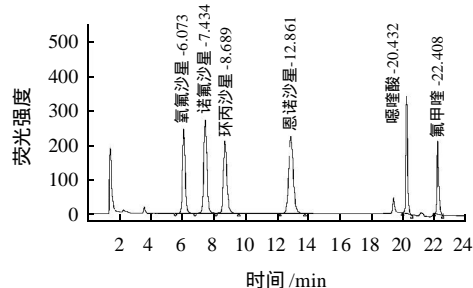


图1 6种喹诺酮类药物标准品色谱图(质量浓度 0.1 μg/mL, 进样量 10 μL)

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed 6 quinolone standards

2.1.2 色谱柱和检测波长的选择

不同厂家生产的 C₁₈ 柱, 由于键合工艺不同而键合密度各不相同, 因此与待测物作用各不相同。且由于 QN_s 的结构中同时包含有氨基和羧基, 属于两性分子, 传统的色谱柱常常会因为残余硅醇基和金属不纯物的存在而导致色谱峰拖尾, 因此分别选取不同品牌号的 C₁₈ 色谱柱进行实验。最终实验选择了以端基封闭的高纯硅胶为固定相的 Zorbax Elipse XDB-C₁₈ 色谱柱, 它能够有效分离检测的 6 种 QN_s, 且耐酸性好, 抗干扰能力强,

重复性好。氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星在激发波长 280nm 和发射波长 480nm 处均具有较强信号; 而噁嗪酸和氟甲喹在激发波长 325nm 和发射波长 365nm 处均具有较强信号。

2.2 样品提取条件的选择

样品前处理过程中提取剂的提取能力有很大差异, 本实验分别比较了酸化乙腈、二氯甲烷、磷酸盐缓冲溶液 3 种提取溶剂的提取效果和提取效率, 综合考虑后, 决定采用酸化乙腈作为提取溶剂。这不仅有效提高提取效果, 而且保证这 6 种喹诺酮类药物在 C₁₈ 固相萃取小柱上的保留能力不受影响。样品预先加入无水硫酸钠进行彻底混合以有利于脱水和盐析作用, 促进提取剂对药物的提取。

2.3 样品净化条件的选择

目前, QN_s 常用的固相萃取柱主要是一些硅基的 C₁₈ 柱和一些聚合材料填充的离子交换 SPE 柱。这些柱子用在同时检测这 6 种 QN_s 时, 必须要优化固相萃取条件, 如提取液、洗脱液以及柱子的活化等, 要综合考虑同一柱子对 QN_s 的提取效果, 可能会出现某几种回收率好, 某些较差的情况。比较了 4 种不同固相萃取小柱对 6 种 QN_s 的提取效率和对基质的净化作用。结果表明: 采用 Varian Bond Elut C₁₈ 柱, 杂质较少, 干扰较小, 回收率高。

2.4 洗脱液浓度和用量的选择

极性较强的甲醇并添加 25% 氨水, 有利于目标物从 C₁₈ 柱上洗脱下来。在一些研究基础上^[12], 实验采用氨化甲醇作为洗脱溶液。分别用不同体积比例的氨化甲醇溶液进行洗脱时发现, 随着甲醇在洗脱液中比例的提高, 6 种 QN_s 的回收率逐渐提高。当用 25% 氨水-甲醇(25:75, V/V)洗脱时, 这 6 种 QN_s 的回收率在 70%~110% 之间。因此选用洗脱液浓度比例为 25:75 的氨化甲醇作为最终洗脱液。为了能够较充分地将 QN_s 洗脱下来, 选择 5mL 的 25% 氨水-甲醇(25:75, V/V)作为最终洗脱体积, 此时杂质干扰小, 回收率高。

表2 喹诺酮类药物回归分析、检出限、定量下限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and limits of detection and quantification of 6 quinolones

| 喹诺酮类药物 | 线性回归方程 | 相关系数 | 检出限 / 定量下限 / (μg/kg) |
|--------|---|--------|----------------------|
| 恩诺沙星 | $Y = 3.99 \times 10^6 X + 3.33 \times 10^5$ | 0.9907 | 2 5 |
| 环丙沙星 | $Y = 3.26 \times 10^6 X - 1.99 \times 10^4$ | 0.9974 | 2 5 |
| 诺氟沙星 | $Y = 4.71 \times 10^6 X + 6.16 \times 10^3$ | 0.9968 | 2 5 |
| 氧氟沙星 | $Y = 3.26 \times 10^6 X + 3.29 \times 10^3$ | 0.9989 | 2 5 |
| 噁嗪酸 | $Y = 2.22 \times 10^6 X + 2.89 \times 10^5$ | 0.9913 | 5 10 |
| 氟甲喹 | $Y = 9.23 \times 10^5 X + 8.09 \times 10^5$ | 0.9944 | 5 10 |

2.5 标准曲线、线性范围、检出限和定量下限

在上述最佳色谱条件下检测一系列的 QN_s 混合标准

表3 罗非鱼中6种喹诺酮药物的添加回收率($n=5$)
Table 3 Spike recoveries of 6 quinolones in tilapia ($n=5$)

| 加标水平 /($\mu\text{g/kg}$) | 环丙沙星 | | 恩诺沙星 | | 诺氟沙星 | | 氧氟沙星 | | 噻啉酸 | | 氟甲喹 | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% |
| 5 | 73.3 | 4.93 | 79.2 | 4.67 | 81.5 | 4.67 | 82.0 | 5.80 | 86.3 | 4.21 | 85.2 | 4.61 |
| 50 | 83.6 | 6.39 | 85.3 | 4.02 | 86.1 | 5.47 | 90.6 | 5.00 | 92.9 | 4.08 | 88.2 | 5.08 |
| 100 | 83.5 | 3.88 | 90.2 | 2.37 | 89.2 | 2.83 | 91.0 | 2.48 | 94.1 | 2.43 | 90.4 | 2.44 |

溶液($0.02 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$),以各组分质量浓度与其色谱峰面积进行线性回归,呈良好线性关系。以3倍信噪比(R_{SN})计算,环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星检出限为 $2 \mu\text{g/kg}$,噻啉酸、氟甲喹检出限为 $5 \mu\text{g/kg}$;以10倍信噪比(R_{SN})计算,环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星定量下限为 $5 \mu\text{g/kg}$,噻啉酸、氟甲喹定量下限为 $10 \mu\text{g/kg}$ 符合欧盟限量要求^[15](表2)。

2.6 回收率和精密度

在空白罗非鱼肉加标水平 $5 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 范围内,根据标准品、加标样和空白样色谱图的峰面积,测得6种QNs(每个浓度平行测定5次)的平均回收率为73.3%~94.1%,相对标准偏差为2.37%~6.39%(表3和图2),表明该方法稳定性强、重现性好,能满足我国对水产品中6种QNs残留检测的要求。

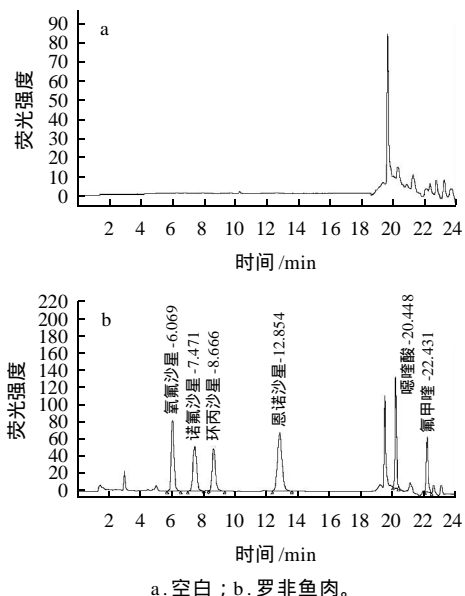


图2 空白及加标罗非鱼肉组织色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of blank (a) and spiked (a) tilapia samples

2.7 验证分析

利用不同样品对此方法进行验证,本实验选择了南美白对虾、罗非鱼、鳊鱼、斑点叉尾鲶4种样品,加标水平为 $50 \mu\text{g/kg}$ (表4)。结果表明,6种QNs平均回收率在78.8%~92.9%之间,相对标准偏差在2.97%~

7.10%之间,定量限水平的药物峰在样品中信噪比均大于10。

表4 不同水产品中6种喹诺酮药物的添加回收率($n=5$)
Table 4 Spike recoveries of 6 quinolones in whiteleg shrimp, tilapia, eel and channel catfish ($n=5$)

| 喹诺酮类药物 ($\mu\text{g/kg}$) | 加标水平/ ($\mu\text{g/kg}$) | 南美白对虾 | | 罗非鱼 | | 鳊鱼 | | 斑点叉尾鲶 | |
|--------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% |
| 恩诺沙星 | 50 | 89.6 | 3.68 | 85.3 | 4.02 | 85.5 | 5.33 | 86.0 | 5.11 |
| 环丙沙星 | 50 | 81.3 | 4.25 | 83.6 | 6.39 | 78.8 | 7.10 | 81.4 | 5.79 |
| 氧氟沙星 | 50 | 88.9 | 3.46 | 90.6 | 5.00 | 85.4 | 4.41 | 88.6 | 3.01 |
| 诺氟沙星 | 50 | 87.7 | 4.35 | 86.1 | 5.47 | 85.0 | 3.66 | 85.1 | 3.34 |
| 噻啉酸 | 50 | 91.0 | 2.97 | 92.9 | 4.08 | 87.8 | 4.78 | 90.6 | 3.12 |
| 氟甲喹 | 50 | 88.0 | 4.58 | 88.2 | 5.08 | 86.8 | 5.40 | 88.5 | 4.00 |

3 结论

本研究采用酸性乙腈溶液提取、Bond Elut C_{18} 净化,建立了水产品中6种喹诺酮类药物残留的高效液相色谱-荧光检测测定方法。该方法简便、快速、精密度高,重现性好,方法的检出限和定量下限低,能满足我国现行兽药残留检测分析的要求,可用于水产品中6种环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噻啉酸、氟甲喹药物残留的确证检测。

参考文献:

- [1] 钱卓真. 动物性食品中喹诺酮类药物残留检测技术研究进展[J]. 福建水产, 2007(4): 61-65.
- [2] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 115.
- [3] BUCKNALL S, SILVERLIGHT J, COLDHAM N, et al. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products [J]. Food Addit Contam, 2003, 20(3): 221-228.
- [4] HOLTZAPPLE C K, BUCKLEY S A, STANKER L H, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross reactivity studies of related fluoroquinolones[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(5): 1984-1990.
- [5] DUAN J H, YUAN Z H. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3): 1696-1700.
- [6] MOSTAFA S, EL-SADEK M, ALLA E A. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28(1): 173-180.

- [7] EL-KOMMOS M E, SALEH G A, EI-GIZAWIS M, et al. Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterials using metal chelation[J]. *Talanta*, 2003, 60(5): 1033-1050.
- [8] 董琳琳, 刘艳华, 汪霞, 等. 反相高效液相色谱法同时测定4种喹诺酮类药物在鸡可食性组织中的残留[J]. *色谱*, 2005, 23(3): 285-288.
- [9] 张德云, 李孟坡, 彭之见. 高效液相色谱法测定鱼肉中4种喹诺酮类药物[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(5): 526-527.
- [10] HOLTZAPPLE C K, BUCKLEY S A, STANKER L H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, 754(1): 1-9.
- [11] 彭涛, 雍伟, 安娟, 等. 反相高效液相色谱/质谱法同时测定鸡肉中5种喹诺酮类药物残留[J]. *分析化学*, 2006, 34(增刊1): 10-14.
- [12] van HOOF N, de WASCH K, OKERMAN L, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1/2): 265-272.
- [13] BARRON D, JIMENEZ-LOZANO E, BAILAC S, et al. Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 767(2): 313-319.
- [14] BELTAGI A M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 31(6): 1079-1088.
- [15] Commission of the European Communities. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE)[EB/OL]. (1990-08-18) [2009-04-20]. http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/atmosfera/ozono/pdf/20000929_L244_1.pdf.